

PTO 99-2592

X-1140B
Rec'd 11-8-99
CY=JP DATE=19961119 KIND=A
PN=08301786

BJ

PREVENTATIVE/CURATIVE DRUG FOR RESORPTIVE BONE DISEASE
[Kyushusei Kotsu Shikkan Yobo/Chiryozai]

Yasuo Takahashi, et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Washington, D.C. April 1999

Translated by: Diplomatic Language Services, Inc.

BEST AVAILABLE COPY

PUBLICATION COUNTRY (19): JP
DOCUMENT NUMBER (11): 08301786
DOCUMENT KIND (12): A
(13):
PUBLICATION DATE (43): 19961119
APPLICATION NUMBER (21): 07113233
APPLICATION DATE (22): 19950511
ADDITION TO (61):
INTERNATIONAL CLASSIFICATION (51): A61K 38/43; A61K 38/46;
C07K 14/745
DOMESTIC CLASSIFICATION (52):
PRIORITY COUNTRY (33):
PRIORITY NUMBER (31):
PRIORITY DATE (32):
INVENTOR (72): TAKAHASHI, YASUO; NAKAYAMA, KAZUO
APPLICANT (71): MOCHIDA PHARMACEUTICALS K.K.
TITLE (54): PREVENTATIVE/CURATIVE DRUG FOR
RESORPTIVE BONE DISEASE
FOREIGN TITLE [54A]: KYUSHUSEI KOTSU SHIKKAN
YOBO/CHIRYOZAI

(Claims)

(Claim 1) A preventative/curative drug for resorptive bone disease, comprising activated protein C and/or protein C as effective ingredients.

(Claim 2) A preventative/curative drug as defined in Claim 1, wherein said resorptive bone disease is osteoporosis.

(Claim 3) A bone resorption inhibitor, comprising activated protein C and/or protein C as effective ingredients.

(Detailed Explanation of the Invention)

(Field of Use in the Industry) The present invention relates to a preventative/curative drug for resorptive bone disease such as osteoporosis, hypercalcemia caused by malignant tumors, or Paget's disease of the bone, as well as a bone resorption inhibitor, comprising activated protein C (below, called APC) and/or protein C (below, called PC) as effective ingredients.

(Prior Art) Bone tissue ceaselessly continues to turnover, and part of bones that already exists is resorbed by osteoclasts, while on the other hand, new bone is formed by osteoblasts. The forms of bone and bone mass are maintained by this bone metabolic turnover. Bone mass is determined by the functional summation of osteoclasts, which resorb bone, and osteoblasts, which form bone (Hideki Yoshikawa, et al., Nihon Rinsho [*Japanese Clinical Medicine*], 52, 2262-2267, 1994).

Resorptive bone disease is a disease in which the amount of bone resorption by osteoclasts becomes greater than the amount of bone formation by osteoblasts. This results in the reduction of bone mass. Among resorptive bone diseases, there are osteoporosis, malignant

hypercalcemia caused by myeloma and lymphoma, and Paget's disease of the bone due to local bone resorption. Within osteoporosis, there are regressive osteoporosis and recurrent osteoporosis. Furthermore, of regressive osteoporosis, there are type I osteoporosis recognized after menopause or after ovariectomy, and type II osteoporosis recognized in the elderly. Recurrent osteoporosis is osteoporosis for which the causes are clear, and the causes include chronic arthritic rheumatism, steroid treatments, hyperthyroidism, sexual dysfunction, hyperparathyroidism, acromegaly, diabetes, Cushing's syndrome, Turner syndrome, the taking of immunosuppressants, gastrectomy, renal failure, renal dialysis, *osteogenesis imperfecta*, hypoalkaline phosphatasemia, homocystinuria, malnutrition, limitation of exercise, staying in bed, alcohol toxicity, space flight, and the like. Also, there is also youth-specific osteoporosis for which the cause is not clear. Resorptive bone disease is attracting attention not only as a medical problem, but as a social one, as well. At present, as the aging of members of society is progressing, bone disease has a high frequency of occurrence, causing broken bones all over the body and also leading to the so-called "bedridden elderly."

Osteoclast groups and osteoblast groups are regulated in the expression of their functions by various hormones, growth factors such as cytokine, and extracellular base proteins. As factors which directly inhibit the differentiation and activation of osteoclasts, there are known calcitonin, prostaglandin, cystine protease inhibitors, C-terminal parathyroid-related proteins, and the like, and the development of curative drugs for resorptive bone disease such as bisphosphonate,

ipriflavone, and the like, is advancing.

PC is a protein having vitamin K dependency, is generated in the liver, and is important as a factor controlling blood clotting. PC inhibits the cascade of clotting by selectively limiting, breaking down, and deactivating activated factor V and activated factor VIII through a complex of thrombin generated in the blood clotting process and thrombomodulin in the *vascular intima* (R. Marlar, et al., *Blood*, 59, 1067-1072, 1982, G.A. Vehar, et al.; *Biochemistry*, 19, 401-410, 1980), and from this fact, the development of PC and APC as anticoagulant drugs is being conducted. Also, with APC, an anti-inflammatory effect is also reported (Kenji Okashima, et al., Abstracts of the 32nd General Conference of the Japan Society of Clinical Hematology, WS111-10, 1990), and as its mechanism of action, the action of inhibiting the activation of white corpuscles, is suggested. Also, it is reported that receptors for APC are expressed in the intimal cells (K. Fukudome, et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 26486-26491, 1994), but its expression in osteocytes is not confirmed, nor is there any report that recorded its having an effect on bone tissue.

(Problems the Invention Attempts to Solve) To date, there have been used as curative drugs for resorptive bone disease such as osteoporosis: estrogen, which is a female hormone and which promotes osteogenesis; activated vitamin D₃, which ameliorates the reduction of bone mass; calcium agents, which are used as supplemental treatments; calcitonin, which has the effect of lowering serum Ca with a peptide hormone secreted from the thyroid gland; elcatonin, which is a derivative of calcitonin; and ipriflavone, which reinforces the effect

of estrogen, and the like. However, estrogen is contraindicated for patients who are at risk of ovarian hemorrhage, thrombosis from long-term use, and estrogen-dependent tumors such as in ovarian cancer. Also, with activated vitamin D₃, calcitonin, elcatonin, and ipriflavone, there are reports of side effects such as ill temper, vomiting and like gastrointestinal disorders, shock, and hypersensitivity, and their effects are not necessarily satisfactory. Also, from the factor that osteoporosis is a disease having a long period of treatment, the development of a safe curative drug having light side effects is an important issue.

(Means for Solving the Problems) In the course of studying the physiological effects of APC on various cells, the inventors have discovered that APC acts on osteocytes and inhibits bone resorption, and by further accumulating devoted research, the present invention was completed.

The present invention is explained in detail below. The first mode of the present invention is a preventative/curative drug for resorptive bone disease comprising APC and/or PC as active ingredients. In resorptive bone disease, there are included osteoporosis, malignant hypercalcemia caused by myeloma and lymphoma, and Paget's disease of the bone due to local bone resorption.

The second mode of the present invention is a preventative/curative drug for osteoporosis, comprising APC and/or PC as active ingredients. In osteoporosis, there are included regressive osteoporosis, recurrent osteoporosis, and youth-specific osteoporosis. Furthermore, in regressive osteoporosis, there are included type I osteoporosis, which

is recognized after menopause or after ovariectomy, and type II osteoporosis, which is recognized in the elderly. Also, as causes of recurrent osteoporosis, there can be mentioned chronic arthritic rheumatism, steroid treatments, hyperthyroidism, sexual dysfunction, hyperparathyroidism, acromegaly, diabetes, Cushing's syndrome, Turner syndrome, the taking of immunosuppressants, gastrectomy, renal failure, renal dialysis, *osteogenesis imperfecta*, hypoalkaline phosphatasemia, homocystinuria, malnutrition, limitation of exercise, staying in bed, alcohol toxicity, space flight, and the like.

The third mode of the present invention is a bone resorption inhibitor, comprising APC and/or PC as active ingredients. Its usefulness is expected in promoting healing after bone breaks, the prevention/cure of broken bones due to fatigue, and raising the rate of acceptance of bone transplants. Also, it is useful as an experimental drug for research.

The APC used in the present invention is a protein having the property of selectively limiting, breaking down, and deactivating activated factor V and activated factor VIII in the cascade of blood clotting. Also, PC, which is converted into APC by a thrombin-thrombomodulin complex in the body, is expected to have the same effect as APC in the preventative/curative drug of the present invention. Accordingly, APC and/or PC may be either natural or produced by genetic engineering, and modified forms obtained by genetic engineering methods are also acceptable. When used as a medical drug, preferably natural human APC and/or PC is/are desired. More preferably, natural human APC is desired. Of such PC, in regard to natural types, there can be

mentioned PC manufactured from human plasma by the method of W. Kisiel (*Journal of Clinical Investigation*, 64, 761-769, 1979), and PC disclosed in the publication of Japanese Laid-Open Patent No. 61-205487, the publication of Japanese Laid-Open Patent No. 62-111690, as well as PC derivatives disclosed in the publication of [European patent] No. EP443875, Japanese Laid-Open Patent No. 4-211380, and the like, as recombinant gene types. Also, although there is no particular restriction in the method of activating PC, it can be implemented, for example, by the method of activation by thrombin (W. Kisiel, *Biochemistry*, 16, 5824-5831, 1977), and the method of activation by fixed thrombin (publication of Japanese Laid-Open Patent No. 3-93799). Also, it can also be implemented by methods of activation by snake venom or synthetic peptides, and the like.

APC, in regard to natural types, is sold commercially on the market, for example, as protein C, activated human (Serbio Laboratory Co.) being a freeze-dried product manufactured from human plasma, or as purified APC (Diagnostica Stago Co.). In regard to recombinant gene types, there can be mentioned active protein C as disclosed in the publication of Japanese Laid-Open Patent No. 62-111690, or activated human protein C as disclosed in the publication of Japanese Laid-Open Patent No. 3-72877.

APC and/or PC are presently anticoagulants under clinical development, there are few side effects, including a tendency for hemorrhage as accompanies heparin, and highly safe medical drugs are expected. Actually, for APC from human blood, its safety has been confirmed by intravenous toxicity tests in mice, general pharmacological

tests, and viral deactivation tests (publication of Japanese Laid-Open Patent No. 6-183996, and Kumiko Aoki, et al., Oyo Yakuri [Applied Pharmacology], 48, 239-250, 1994). Also, with heparin and low molecular-weight heparin, it is known that there is a reduction of bone mass by its use (Masahiko Nishiyama, et al., Abstracts of the 68th Annual Conference of the Japanese Pharmacological Society, P₂293, 1995). Meanwhile, from the fact the APC and/or PC used in the present invention inhibit bone resorption, APC and/or PC differ from heparin and low molecular-weight heparin in that they are anticoagulants having the effect of increasing bone density.

APC and/or PC used in the present invention have the effects of inhibiting bone resorption. Accordingly, they can be used as preventative/curative drugs for various resorptive bone diseases, for example, osteoporosis, Paget's disease of the bone, and hypercalcemia subsequent to malignant tumors, and the like. Also, they can be used in collagen diseases that are centered on chronic arthritic rheumatism, and progressive bone embrittlement. Accordingly, the drugs can be used for the purpose of preventing/curing or improving, for example, bone destruction in chronic arthritic rheumatism or the reduction of bone mass which is one side effect of steroid treatments, and furthermore the promotion of cure of these diseases is expected. Furthermore, from the fact that the APC and/or PC used in the present invention inhibit bone resorption, the promotion of healing after bone breaks in various places, the prevention/cure of broken bones by fatigue, or raising the rate of acceptance of bone transplants are expected.

The drug preparation of the present invention should contain APC

and/or PC, and it can be manufactured by all pharmaceutical manufacturing methods. Said APC and/or PC can be prepared with any suitable carrier or medium generally used as a drug, for example, sterilized water or physiological saline solution, vegetable oil, mineral oil, high-grade alcohol, high-grade fatty acid, a harmless organic solvent, and the like, and may be further combined according to need with an excipient, coloring agent, emulsifier, suspension agent, surfactant, solubility aid, anti-adhesive, stabilizer, preservative, moisturizer, antioxidant, buffer, isotonicizer, pain reliever, and the like, into a drug preparation such as an injectable drug, nasal absorbent, oral drug, or embedded preparation; most preferably an injectable drug. Several specific examples of these are well known. As an injectable drug, it can be provided, for example, as a freeze-dried product, an injectable liquid, or in a form sealed in an infusion pump. Also, as a time-released preparation, it can also be taken in a form contained inside a microcapsule, microsphere, ribosome or nanosphere, or as a preparation containing a polymer base.

The preparation of the present invention can be taken by methods such as, for example, intravenous injection, subdermal injection, intramuscular injection, and in-joint injection, in a quantity of about 1-2000 μ g/kg, preferably about 10-1000 μ g/kg as quantity of APC and/or PC protein, and it can be taken continuously by keeping it attached to the body as an embedded preparation or sealed in an infusion pump, and the like.

(Experimental Examples) In order to explain the present invention in detail, the effects are explained specifically below according to

experimental examples. However, the present invention is by no means limited to these.

(Experimental Example 1: Effect of human-originating APC on bone resorption) After removing the soft tissue, a mouse shin bone and thigh bone were thinly sliced in an α -MEM medium and further mixed with a touch mixer, and then it was set aside and the obtained supernatant was used as the total osteocytes including osteoclasts. Next, following the method of Y. Takeda, et al. (*Bone and Mineral*, 17, 347-357, 1992), the effect of the tested drug on the formation of resorption pits by the osteoclasts on slices of ivory was examined. The ivory was cut into round ivory slices having a thickness of about 150μ and a diameter of about 6mm, the total osteocytes including the osteoclasts were applied and incubated for 2 hours at 37°C , then the adhered cells were removed, and the α -MEM medium was added and cultured for 5 days. On the fifth day, 0.25M of ammonia was added and the reaction was stopped, and then the cells adhered to the ivory slices were removed by ultrasound processing. The surface area of the formed resorption pits was dyed with acidic hematoxylin, and then it was measured under a microscope. The effect of the tested drug was computed as the [percentage] rate of inhibition according to differences in the surface area of resorption pits of the group not having the tested drug added and the group having the tested drug. The results are shown in Figure 1 and Figure 2 [sic: no Figure 2 included]. As is clear from Figure 1, APC and elcatonin inhibited the formation of resorption pits on the ivory slices dependent on volume. This formation of resorption pits on ivory slices is an indicator of bone resorption, and it is inhibited by drugs used for

resorptive bone disease, such as elcatonin. Consequently, APC is believed to be a preferable drug for its preventative/curative effect on resorptive bone disease.

(Embodiments) The present invention is explained more specifically by presenting embodiments below, but the present invention is not limited to these.

(Embodiment 1)

| | |
|------------------|--------|
| APC | 10mg |
| Refined gelatin | 20mg |
| Sodium phosphate | 34.8mg |
| Sodium chloride | 81.8mg |
| Mannitol | 25mg |

The above ingredients were dissolved in 10ml distilled water for injection, and after having been filtered for bacteria, it was apportioned into 1.0ml sterile vials and freeze-dried to prepare an injectable preparation.

(Embodiment 2)

| | |
|------------------|--------|
| APC | 50mg |
| Albumin | 20mg |
| Sodium phosphate | 34.8mg |
| Sodium chloride | 81.8mg |
| Mannitol | 25mg |

The above ingredients were dissolved in 10ml distilled water for injection, and after having been filtered for bacteria, it was apportioned into 1.0ml sterile vials and freeze-dried to prepare an injectable preparation.

(Effect of the Invention) The preventative/curative drug having APC and/or PC as active ingredients of the present invention has the effect of inhibiting bone resorption. Accordingly, it can be used as a preventative/curative drug for various diseases in which bone resorption is advanced, for example, resorptive bone diseases such as osteoporosis, malignant hypercalcemia, Paget's disease of the bone, and reduction of bone due to chronic arthritic rheumatism, and as a bone resorption inhibitor for promotion of healing after bone breaks and as a test drug for research. Also, the APC and/or PC of the present invention are expected to have fewer side effects compared with already-existing drugs, and they should serve as safe curative drugs for which long-term use is possible. Furthermore, because the APC and/or PC of the present invention have few side effects, such as a tendency for hemorrhage and the reduction of bone mass which follow treatment by heparin and low molecular-weight heparin, they have a higher level of safety when used as anticoagulants, and as dialysis drugs, as well.

(Brief Explanation of the Drawing)

(Figure 1) is a graph showing the effects of APC used in the present invention and elcatonin in inhibiting formation of resorption pits in ivory.

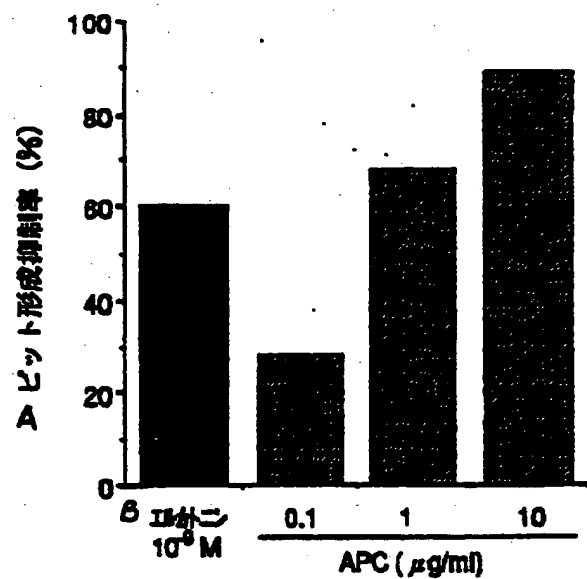


Figure 1

[Key:]

A. rate of inhibition of pit formation (%); B. elcatonin

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-301786

(43) 公開日 平成8年(1996)11月19日

| (51) Int. Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|----------------------------|-------|---------|----------------|--------|
| A 6 1 K 38/43 | A B J | | A 6 1 K 37/465 | A B J |
| 38/46 | A D D | 8517-4H | C 0 7 K 14/745 | |
| C 0 7 K 14/745 | | | A 6 1 K 37/54 | A D D |

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平7-113233

(22) 出願日 平成7年(1995)5月11日

(71) 出願人 000181147

持田製薬株式会社

東京都新宿区四谷1丁目7番地

(72) 発明者 高 橋 靖 雄

東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内

(72) 発明者 中 山 和 男

東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内

(74) 代理人 弁理士 渡辺 望裕 (外1名)

(54) 【発明の名称】 吸収性骨疾患予防・治療剤

(57) 【要約】

【目的】 吸収性骨疾患を予防または治療する効果があり、副作用が軽度で安全な治療剤の提供、または骨吸収抑制剤の提供。

【構成】 活性化プロテインCおよび／またはプロテインCを有効成分として含有することを特徴とする吸収性骨疾患の予防・治療剤、または骨吸収抑制剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】活性化プロテインCおよび／またはプロテインCを有効成分とすることを特徴とする吸収性骨疾患予防・治療剤。

【請求項2】前記吸収性骨疾患が骨粗鬆症である請求項1記載の予防・治療剤。

【請求項3】活性化プロテインCおよび／またはプロテインCを有効成分とすることを特徴とする骨吸収抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は活性化プロテインC（以下、APCと略す）および／またはプロテインC（以下、PCと略す）を有効成分とすることを特徴とする骨粗鬆症、悪性腫瘍等による高カルシウム血症または骨ページェット病等の吸収性骨疾患の予防・治療剤、および骨吸収抑制剤に関する。

【0002】

【従来の技術】骨組織は、絶えず代謝回転を続けており、既存骨の一部は破骨細胞により吸収され、一方では、骨芽細胞により新生骨が形成されている。骨の形態、骨量は、この骨代謝回転により維持されている。骨量は、骨を吸収する破骨細胞群と骨を形成する骨芽細胞群の機能的総和により決定される（吉川秀樹ら、日本臨床、52、2262-2267、1994）。

【0003】吸収性骨疾患とは、破骨細胞群による骨吸収量が骨芽細胞群による骨形成量より大となり、結果として骨量の減少が生じる疾患である。吸収性骨疾患には骨粗鬆症、骨髄腫やリンパ腫が原因でおこる悪性高カルシウム血症、局所性骨吸収による骨ページェット病がある。骨粗鬆症には、退行期骨粗鬆症と続発性骨粗鬆症があり、さらに退行性骨粗鬆症は閉経後あるいは卵巣摘出後に認められるI型骨粗鬆症と、老人に認められるII型骨粗鬆症がある。続発性骨粗鬆症とは、原因が明らかな骨粗鬆症であり、慢性関節リュウマチ、ステロイド療法、甲状腺機能亢進症、性腺機能低下症、副甲状腺機能亢進症、末端肥大症、糖尿病、クッシング症候群、ターナー症候群、免疫抑制剤の投与、胃切除、腎不全、腎透析、骨形成不全症、低アルカリフォスファターゼ血症、ホモシスチン尿症、栄養障害、運動制限、寝たきり、アルコール中毒、宇宙飛行などが原因となる。また、原因が明らかでない特発性若年性骨粗鬆症もある。吸収性骨疾患はその頻度の高さに加え身体各部の骨折を引き起こして、いわゆる「寝たきり老人」に至らしめる原因疾患として、高齢化社会の進む現在、医療のみならず、社会問題としても注目されている。

【0004】破骨細胞群および骨芽細胞群は、その機能の発現にあたって、さまざまなホルモンやサイトカインなどの液性因子や細胞外基質蛋白による調節を受けている。破骨細胞の分化や活性化を直接抑制する因子として

は、カルシトニン、スタグランジン、システインプロテアーゼ阻害剤、C末端副甲状腺関連蛋白質などが知られており、ビスホスホネート、イブリフラボンなどの吸収性骨疾患治療剤の開発が進められている。

【0005】PCは肝臓で生成されるビタミンK依存性蛋白質で、血液凝固の制御因子として重要である。PCは血液凝固の過程で生成されたトロンビンと血管内皮膜上のトロンボモジュリンとの複合体によって活性化されAPCとなる。生じたAPCは血液凝固因子である活性化第V因子および活性化第VIII因子を選択的に限定分解し失活させることにより凝固カスケードを阻害する〔マーラー・アール（Marlar R.）ら、ブラッド（Blood）、59、1067-1072、1982、ベハー・ジー・エー（Vehar G. A.）ら、バイオケミストリー（Biochemistry）、19、401-410、1980〕ことから、PCおよびAPCは抗凝固薬としての開発が行われている。また、APCでは抗炎症作用も報告されており（岡嶋研二ら、第32回日本臨床血液学会総会抄録集、WS III-10題、1990）その作用機序としては、APCの白血球活性化抑制作用が示唆されている。また、血管内皮細胞にはAPCに対するレセプターが発現していることも報告されている〔フクドメ・ケー（Fukudome K.）ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（The Journal of Biological Chemistry）、269、26486-26491、1994〕が、骨細胞での発現は確認されていないし、骨組織に対して作用を有することを記載した報告もない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】これまで、骨粗鬆症等の吸収性骨疾患の治療には、女性ホルモンの一つであり骨形成を促進するエストロゲン、骨量減少を改善する活性型ビタミンD₃、補充療法として用いられるカルシウム剤、甲状腺から分泌されるペプチドホルモンで血清のCa低下作用を有するカルシトニン、カルシトニンの誘導体であるエルカトニン、エストロゲンの作用を増強するイブリフラボン等が用いられている。しかしながら、エストロゲンでは子宮出血や、長期投与により血栓症や癌の発症が報告されており、血栓症および乳癌や子宮癌などのエストロゲン依存性腫瘍の疑いのある患者には禁忌とされている。また、活性型ビタミンD₃、カルシトニン、エルカトニン、イブリフラボンでは悪心、嘔吐等の胃腸障害、ショック症状、過敏症等の副作用が報告されており、その効果は必ずしも満足のいくものではない。骨粗鬆症は治療期間の長い疾患であることから、副作用が軽度な、安全な治療薬を開発することは重要な課題である。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は、APCの各

種細胞に対する生理作用に関する研究を行っている途上、APCが骨細胞に作用し、骨吸収を抑制することを見だし、さらに鋭意研究を重ねて本発明を完成した。

【0008】以下に本発明を詳細に説明する。本発明の第一の態様は、APCおよび/またはPCを有効成分として含有することを特徴とする吸収性骨疾患予防・治療剤である。吸収性骨疾患には、骨粗鬆症、骨髄腫やリンパ腫が原因でおこる悪性高カルシウム血症、局所性骨吸収による骨ページェット病が含まれる。

【0009】本発明の第二の態様は、APCおよび/またはPCを有効成分とすることを特徴とする骨粗鬆症予防・治療剤である。骨粗鬆症には、退行性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症および特発性若年性骨粗鬆症が含まれる。さらに、退行性骨粗鬆症には閉経後あるいは卵巣摘出後に認められるI型骨粗鬆症と、老人に認められるII型骨粗鬆症が含まれ、また、続発性骨粗鬆症の原因としては慢性関節リュウマチ、ステロイド療法、甲状腺機能亢進症、性腺機能低下症、副甲状腺機能亢進症、末端肥大症、糖尿病、クッシング症候群、ターナー症候群、免疫抑制剤の投与、胃切除、腎不全、腎透析、骨形成不全症、低アルカリフォスファターゼ血症、ホモシスチン尿症、栄養障害、運動制限、寝たきり、アルコール中毒、宇宙飛行などが挙げられる。

【0010】本発明の第三の態様は、APCおよび/またはPCを有効成分とすることを特徴とする骨吸収抑制剤である。骨折後の治癒促進、疲労骨折の予防・治療あるいは骨移植の生着率上昇に有用性が期待される。また、研究用試薬としても有用である。

【0011】本発明に用いるAPCは、血液凝固カスケードにおける活性化第V因子および活性化第VIII因子を選択的に限定分解し失活させる性質を有する蛋白質である。また、生体内でトロンビン-トロンボモジュリン複合体によりAPCに変換されるPCも本発明の予防・治療剤においてはAPCと同様の効果が期待される。従って、APCおよび/またはPCは、天然型あるいは遺伝子工学的に産生されたいずれでも良く、遺伝子工学手法により得られる改変型であってもよい。医薬品とする場合、好ましくはヒト由来のAPCおよび/またはPCが望まれる。更に好ましくはヒト由来のAPCが望まれる。このようなPCは、天然型については、キシール・ダブリュー (Kissiel, W) の方法 [ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲーション (Journal of Clinical Investigation)、64、761-769、1979] 等によりヒト血漿から製造されたPC、遺伝子組換え型については特開昭61-205487号公報、特開昭62-111690号公報等に開示されているPC、およびEP443875号公報、特開平4-211380号公報等に開示されているPC誘導体があげられる。また、PCを活性化する方法には特に制約はないが、例えば、トロ

ンビンにより活性化する方法 [キシール・ダブリュー (Kissiel, W)、バイオケミストリー (Biochemistry)、16、5824-5831、1977]、固定化したトロンビンにより活性化する方法 (特開平3-93799号公報) により実施できる。また、蛇毒あるいは合成ペプチドにより活性化する方法等により実施することもできる。

【0012】APCは、天然型については、例えば、ヒト血漿から製造された凍結乾燥品であるプロテインC、アクチベータド、ヒューマン (Protein C, Activated, Human) (セルビオ ラボラトリー (Serbio Laboratory) 社) あるいはピュアリファイド APC (Purified APC) (ダイアグノスティカ スタゴ (Diagnostic Stago) 社) が市販されている。遺伝子組換え型については、特開昭62-111690号公報に開示されている活性化プロテインC、あるいは、特開平3-72877号公報に開示されている活性化ヒトプロテインC誘導体があげられる。

【0013】APCおよび/またはPCは現在臨床開発中の抗凝固薬であり、ヘパリンに付随するような出血傾向などの副作用も少なく、医薬品としての安全性が高いことが期待されている。実際、ヒト血液由来APCは、マウスでの単回静脈内投与毒性試験、一般薬理試験、ウイルス不活性化試験等によりその安全性が確認されている (特開平6-183996号公報、青木久美子ら、応用薬理、48、239-250、1994)。また、ヘパリンおよび低分子ヘパリンでは、その投与により骨量が減少することが知られている (西山雅彦ら、第68回日本薬理学会年会抄録集、P₂293題、1995)。一方、本発明に用いるAPCおよび/またはPCは骨吸収を抑制することから、APCおよび/またはPCはヘパリンおよび低分子ヘパリンとは異なり、骨密度を高める作用を有する抗凝固薬である。

【0014】本発明に用いるAPCおよび/またはPCは、骨吸収抑制作用を有する。従って、種々の吸収性骨疾患、例えば、骨粗鬆症、骨ページェット病または悪性腫瘍等に付随する高カルシウム血症などの予防・治療剤として使用することができる。また、慢性関節リュウマチを中心に膠原病では骨の粗鬆化が進行している。従って、種々の膠原病、たとえば慢性関節リュウマチにおける骨破壊、あるいはステロイド療法の副作用の一つである骨量の減少を予防・治療または改善する目的で使用するができ、さらにはこれらの疾患の治療促進が期待される。さらに、本発明に用いるAPCおよび/またはPCは骨吸収を抑制することから、各部位の骨折後の治癒の促進、疲労骨折の予防・治療あるいは骨移植の生着率を上げることが期待される。

【0015】本発明の製剤は有効成分としてAPCおよび/またはPCを含有していれば良く、公知のいかなる

製剤学的製造法によって製造することができる。当該APCおよび／またはPCは、薬剤として一般的に用いられる適当な担体または、媒体、例えば滅菌水や生理食塩水、植物油、鉱油、高級アルコール、高級脂肪酸、無害性有機溶媒等、さらには必要に応じて賦形剤、着色剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、溶解補助剤、吸着防止剤、安定化剤、保存剤、保湿剤、酸化防止剤、緩衝剤、等張化剤、無痛化剤等と適宜組合わせて、生体に効果的に投与するのに適した注射剤、経鼻吸収剤、経口剤、埋め込み製剤等の医薬品製剤、好ましくは注射剤に調製することができ、これらの具体例のいくつかについては公知である。注射剤の製剤としては、例えば凍結乾燥品や、注射用水剤、あるいは浸透圧ポンプに封入した形等で提供できる。また、徐放性製剤として、マイクロカプセル、マイクロスフェア、リボソームあるいはナノスフェアに内包した形態あるいは高分子基剤含有製剤として投与することもできる。

【0016】本発明の製剤は、例えば静脈内注射、皮下注射、筋肉内注射、関節内注射、経口投与等の方法によって、例えば、APCおよび／またはPC蛋白量として一日約1～2000 μ g/kg、好ましくは、約10～1000 μ g/kgとなる量を投与したり、埋め込み製剤や浸透圧ポンプ等に封入し生体に留置することにより連続的に投与することができる。

【0017】（実験例）以下に本発明を詳細に説明するために実験例により効果を具体的に説明するが、本発明はこれらによって、なんら限定されるものではない。

【0018】（実験例1：ヒト由来APCによる骨吸収に対する効果）軟部組織を除去したマウス脛骨および大腿骨を α -MEM培地中で細断し、さらにタッチミキサーで攪拌した後、静置して得られた上清画分を破骨細胞を含む全骨細胞として用いた。次にタカダ・ワイ（Takada Y.）らの方法[Bone and Mineral, 17, 347-359, 1992]に準じ、象牙の切片上での破骨細胞による吸収窩形成に対する被検薬の阻害効果をしらべた。象牙を厚さ約150 μ m、直径6mmの円形の象牙片に調製し、5%ウシ胎児血清を含む α -MEM培地の入った96穴プレート中でブレインキュベートした。象牙片上に、破骨細胞を含む全骨細胞を加え37℃にて2時間インキュベートした後、非付着細胞を除去し、被検薬を含む α -MEM培地を添加し5日間培養した。なお、培地は培養開始3日目に交換した。培養5日目に0.25Mアンモニア水を添加し反応を停止後、超音波処理により象牙片上に付着した細胞を取り除いた。形成された吸収窩の面積は酸性ヘマトキシリンで染色した後、顕微鏡下で測定した。被検薬の効果は被検薬未添加群と被検薬群の吸収窩の面積より阻害率として算出し

た。結果を図1および図2に示す。図1から明らかなように、APCおよびエルカトニンは象牙片上の吸収窩形成を用量依存的に抑制した。この象牙片上の吸収窩形成は骨吸収の指標であり、エルカトニン等の吸収性骨疾患に用いられている薬剤により抑制される。ゆえに、APCは、吸収性骨疾患の予防・治療作用を有する好ましい薬剤であると考えられる。

【0019】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0020】（実施例1）

| | |
|----------|---------|
| APC | 10 mg |
| 精製ゼラチン | 20 mg |
| リン酸ナトリウム | 34.8 mg |
| 塩化ナトリウム | 81.8 mg |
| マンニトール | 25 mg |

上記成分を注射用蒸留水10mlに溶解、無菌濾過したあとに1.0mlずつ無菌バイアルに分注し、凍結乾燥して注射用製剤を調整した。

【0021】（実施例2）

| | |
|----------|---------|
| APC | 50 mg |
| アルブミン | 20 mg |
| リン酸ナトリウム | 34.8 mg |
| 塩化ナトリウム | 81.8 mg |
| マンニトール | 25 mg |

上記成分を注射用蒸留水10mlに溶解、無菌濾過したあとに1.0mlずつ無菌バイアルに分注し、凍結乾燥して注射用製剤を調整した。

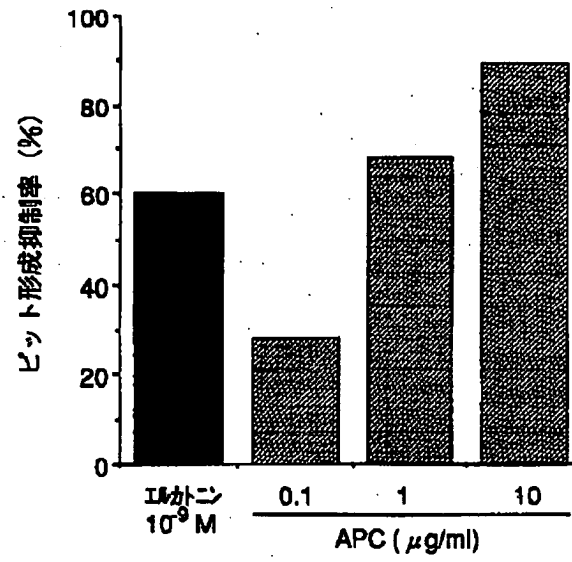
【0022】

【発明の効果】本発明のAPCおよび／またはPCを有効成分とする予防・治療剤は、骨吸収抑制作用を有する。従って、種々の骨吸収が亢進している疾患、たとえば骨粗鬆症、悪性高カルシウム血症、骨ページェット病および慢性関節リュウマチ等による骨減少等の吸収性骨疾患の予防・治療剤、ならびに骨折後の治癒促進や研究用試薬としての骨吸収抑制剤として用いることができる。また、本発明のAPCおよび／またはPCは既存薬に比べ副作用が少ないことが期待され、長期間の投与が可能な安全な治療薬となりうる。さらに、本発明のAPCおよび／またはPCは、ヘパリンや低分子ヘパリンによる治療に付随する出血傾向や骨量減少等の副作用が少ないため、抗凝固剤や透析用剤として用いる際にも安全性の高いものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明に用いるAPCおよびエルカトニンの象牙における吸収窩の形成を抑制する効果を示すグラフである。

【図1】



THIS PAGE BLANK (USPTO).

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)